

DIFERÈNCIES D'EXPRESSIONI PROTEICA ENTRE MOSTRES DE PACIENTS ASTENOZOOSPÈRMICS I NORMOZOOSPÈRMICS

Juan Martínez-Heredia,¹ Sara de Mateo,¹ José M Vidal-Taboada,¹
José Luis Ballecà,² Rafael Oliva^{1*}

¹ Grup de Genètica Humana, IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona
Casanova, 143. 08036 Barcelona. *roliva@ub.edu*.

¹ Servei de Genètica, Hospital Clínic i Provincial

² Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i Neonatologia. Hospital Clínic i Provincial
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.

Resum

El nostre laboratori ha descrit parcialment el proteoma de l'espermatozoide humà. Hem descrit 98 proteïnes de funcions i vies metabòliques molt diversos (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). En aquest treball hem comparat el patró proteòmic de mostres de pacients astenozoospermics i normozoospermics per tal de trobar diferències a l'expressió proteica. L'anàlisi estadística dels gels tenyits amb plata ens ha permès identificar set proteïnes amb diferències significatives entre els dos grups. Aquestes proteïnes s'han trobat també en un gel tenyit amb DIGE, fet que confirma aquests resultats. La combinació d'aquestes dades ens ha permès fer un arbre de relacions, que ens ha agrupat els pacients segons la mobilitat dels seus espermatozoides, i que ens ha separat els pacients normozoospermics en dos grups corresponents al «problema masculí» i al «problema femení». En definitiva, aquestes dades ens han proporcionat una sèrie de pistes importants sobre l'origen del problema dels pacients astenozoospermics.

Paraules clau 2D-PAGE, humà, proteoma, espermatozoide.

Abstract

Our lab has partially described the proteome of human spermatozoon. We described 98 proteins, belonging to a variety of functions and metabolic pathways (Martínez-Heredia *et al.*, 2006). In this work, we have compared the proteomic content of asthenozoospermics and normozoospermics samples, in order to search for differences in protein expression. The statistical analyses of silver stained gels allow us to identify 7 proteins with statistically significant differences. These proteins have also been found in a DIGE assay, confirming these results. The combination of this data has led us to cluster a tree which groups the different patients according to its motility and separate from the normozoospermic patients into male-problem and female-problem groups. This data already provides an important clue to the identification of the origin of the problem of asthenozoospermic patients.

INTRODUCCIÓ I METODOLOGIA

La infertilitat és un problema que afecta aproximadament un 10-15 % de les parelles en edat reproductiva i, aproximadament, la meitat dels casos és deguda a problemes d'origen masculí (Oliva i Ballecà, 1999). L'OMS ha establert una sèrie de paràmetres seminals per a diferenciar entre mostres normals i patològiques (OMS, 1999), però són paràmetres fonamentalment de tipus morfològic i no expliquen els casos d'infertilitat idiopàtica. Per exemple, la causa d'infertilitat en els pacients normozoospermics continua sent desconeguda. És molt probable que una

proporció important sigui deguda a mutacions recessives (Lilford *et al.*, 1994) que poden provocar alteracions en les proteïnes, alteracions que avui dia podem trobar. Per exemple, en treballs previs del nostre laboratori hem demostrat la presència d'una baixada o absència de protamina P2 en espermatozoides de pacients infèrtils (de Yebra *et al.*, 1993, 1998), a part de demostrar la importància del precursor de la P2 en temes relacionats amb la infertilitat (Torregrosa *et al.*, 2006). Però la P2 (i el seu precursor) són només una de les milers de proteïnes que es poden trobar a l'espermatozoide humà.

Després de descriure part del proteoma de l'esper-

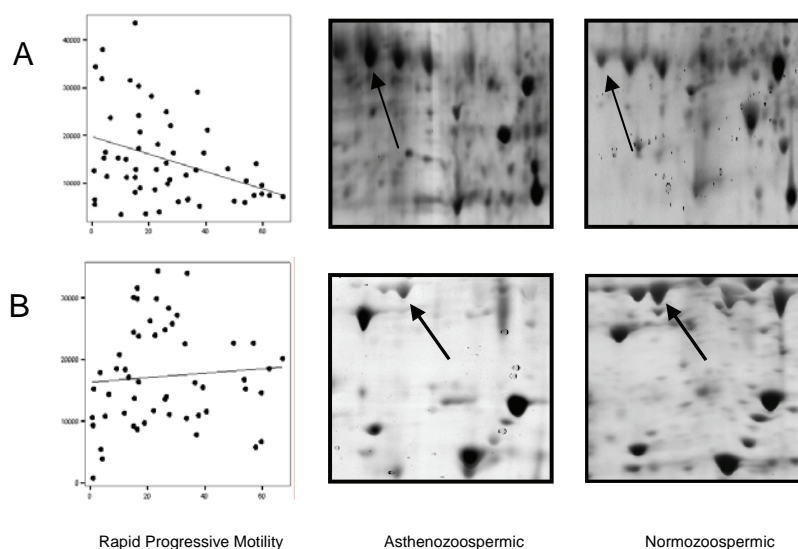


Figura 1 Dos exemples de proteïnes amb expressió alterada. En A tenim una proteïna que augmenta en els astenozoospèrmics. En B, tenim una proteïna que disminueix.

matzoide humà (Martínez-Heredia *et al.*, 2006), el següent objectiu al nostre laboratori ha estat la comparació del proteoma entre tres grups diferents: dos grups d'homes amb problemes d'infertilitat a la parella (astenozoospèrmics i normozoospèrmics) i un grup control. Es van analitzar un total de 57 homes, repartits de la següent manera: 27 pacients normozoospèrmics, 20 pacients astenozoospèrmics i 10 controls. Les ejaculacions es van tractar segons el mètode descrit per Pixton *et al.* (2004), amb variacions. Les mostres se separen inicialment en un gradient de Percoll del 50 %, per a separar els espermatozoides dels altres tipus de cèl·lules presents a la mostra (Mengual, 2003), i el *pellet* es resuspèn en el medi de lisi descrit per Pixton *et al.* (2004), format bàsicament per agents caotrópics i detergents. Es resuspèn en la quantitat suficient perquè quedi a una concentració de 230×10^6 espermatozoides/ml (concentració òptima determinada al nostre laboratori) i es deixa lisar durant 1 h a temperatura ambient en agitació.

Una vegada lisades les mostres, es procedeix a la separació electroforètica, utilitzant el protocol de la casa comercial BioRad (2004). Es va utilitzar un aparell IPGphor, amb tires de 17 cm i un rang de pH de 5 a 8. La segona dimensió es va córrer a 300 V, durant aproximadament 3 h amb gels de poliacrilamida al 12 %. Posteriorment, es va procedir a la tinció argèntica d'aquests, seguint un protocol basat en Blum *et al.* (1987).

Els gels tenyits s'escanegen a elevada resolució amb l'escàner GS-800 (BioRad), i es guarden amb el format requerit pel programa d'anàlisi PDQuest (BioRad). Un cop analitzats tots els gels, els valors nor-

malitzats d'intensitat s'analitzen amb el programa estadístic SPSS, utilitzant el test de Mann-Whitney per a buscar diferències estadístiques entre els diferents grups en relació a la seva mobilitat linear progressiva.

A més, s'ha utilitzat el programa Cluster&TreeView amb les proteïnes diferencials per tal d'agrupar els pacients segons la seva mobilitat.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

El test Mann-Whitney, que compara els valors de mobilitat +++ (mobilitat ràpida progressiva) entre els quartils superior i inferior, ens dona com a resultat l'obtenció de set proteïnes amb una expressió diferencial. D'aquestes set proteïnes, cinc es troben augmentades en pacients astenozoospèrmics i les altres dues, reprimides. Trobem dos exemples d'aquestes proteïnes en la figura 1.

Les funcions d'aquestes proteïnes són diverses, i es troben entre aquestes tres formes precursors. L'augment dels precursors en els pacients astenozoospèrmics podria indicar una fallida del processament, a més d'afectar les vies on aquestes proteïnes es troben implicades.

A més, trobem entre aquestes proteïnes algunes de relacionades amb la producció d'energia. La troballa d'aquestes proteïnes es pot explicar ràpidament si tenim en compte l'elevada despesa energètica que necessita l'espermatozoide per a moure's. Qualsevol fallida en el subministrament energètic podria conduir a una reducció de la mobilitat, fet que caracteritza els astenozoospèrmics.

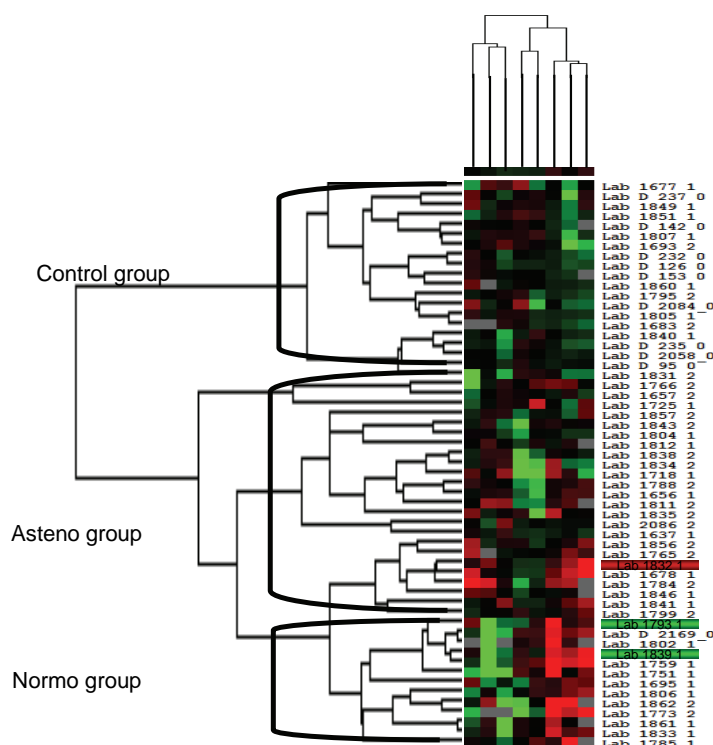


Figura 2 Arbre que agrupa els pacients segons l'expressió de les proteïnes diferencials.

La resta de proteïnes tenen una funció «morfològica». Una alteració en la funció d'aquestes proteïnes pot conduir a canvis en la forma hidrodinàmica de l'espermatozoide, i afecta també el seu moviment.

En conjunt, aquestes proteïnes poden explicar (almenys, en part) la disminució de moviment en els pacients astenozoospermics.

Quan es mira com agrupen els patrons d'expressió d'aquestes proteïnes els pacients, ens trobem que el patró agrupa força bé els tres diferents grups. Si, a més, mirem els resultats de reproducció assistida per als pacients normozoospermics (només disponible per a tres), veiem que el pacient agrupat amb els astenozoospermics és un pacient en què s'ha determinat que el problema és d'origen masculí. Així, tot i que s'ha de confirmar amb més dades, sembla que aquestes proteïnes agrupen també els pacients normozoospermics segons si el problema a la parella és d'origen masculí o femení.

BIBLIOGRAFIA

- BIO RAD (2004). *2D Electrophoresis for proteomics. A methods and product manual*. www.bio-rad.com
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. (1987). «Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels». *Electrophoresis*, 8: 93-99.
- DE YEBRA, L.; BALLESCÀ, J. L.; VANRELL, J. A.; BASSAS, L.; OLIVA, R. (1993). «Complete selective absence of protamine P2 in humans». *J. Biol. Chem.*, 268: 10553-10557.
- DE YEBRA, L.; BALLESCÀ, J. L., VANRELL, J. A.; CORZETT, M.; BALHORN, R.; OLIVA, R. (1998). «Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels». *Fertil. Steril.*, 69: 755-759.
- LILFORD, R.; JONES, A. M.; BISHOP, T. D. [et al.] (1994). «Case-control study of whether subfertility in men is familial». *Br. Med. J.*, 309: 570-573.
- MARTINEZ-HEREDIA, J.; ESTANYOL, J. M.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Proteomic identification of human sperm proteins». *Proteomics*, 6(15): 4356-4369.
- MENGUAL, L. (2003). *Infertilitat masculina: causes, factors de risc genètic i caracterització molecular dels espermatozoides*. Tesi doctoral.
- OLIVA, R.; BALLESCÀ, J. L. (1999). *Valoración genética de la pareja estéril o infértil*. Madrid: Asociación Española de Andrología.
- ORGANITZACIÓ MUNDIAL DE LA SALUT (1999). *WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press, 4a ed.
- PIXTON, K. L.; DEEKS, E. D.; FLESCHE, F. M.; MOSELEY, F. L. [et al.] (2004). «Sperm proteome mapping of a patient who experienced failed fertilization at IVF reveals altered expression of at least 20 proteins compared with fertile donors: case report». *Hum. Reprod.*, 19: 1438-1447.

- TORREGROSA, N., DOMINGUEZ-FANDOS, D.; CAMEJO, M, I.; SHIRLEY, C. R.; MEISTRICH, M. L.; BALLESCA, J. L.; OLIVA, R. (2006). «Protamine 2 precursors, protamine 1/protamine 2 ratio, DNA integrity and other sperm parameters in infertile patients». *Hum Reprod.*, 21(8): 2084-2089.